



ImmunoComb®

TOXO IgG



Code: 50440002

Format: 3 x 12 tests

Только для *in vitro* диагностики

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И
СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2007/00769
от 15 июня 2009 г.

Назначение

ИФА тест-система ИммуноКомб «ImmunoComb® Toxo IgG» – это быстрый тест, предназначенный для количественного определения IgG антител к *Toxoplasma gondii* (Тохоплазма gondii) в сыворотке или в плазме крови человека. Набор предназначен для проведения 36 тестов.

Введение

Токсоплазмоз (*Toxoplasmosis*) - это системное заболевание, вызываемое простейшими микроорганизмами *Toxoplasma gondii* (Т. gondii). Этот паразит широко распространен и способен инфицировать многие виды млекопитающих, особенно часто встречается в тропиках и реже в холодных, безводных регионах. Серологические исследования выявили частоту инфицирования данным заболеванием менее 1% среди молодежи в некоторых регионах и до 90% среди людей пожилого возраста в других регионах. Основные пути передачи инфекции человеку - врожденный и оральный, при употреблении зараженной пищи. Реже встречается, но имеет важное клиническое значение, передача инфекции от человека к человеку через зараженные продукты крови и трансплантаты. Наиболее общим клиническим проявлением инфекции является сама собой проходящая фебрильная лимфаденопатия, протекающая субклинически или со слабыми клиническими проявлениями у здоровых взрослых. Тем не менее, инфицирование пациента с нарушенной иммунной системой или инфицирование развивающегося плода может привести к весьма серьезным последствиям. Опортунистический токсоплазмоз или реактивация субклинической инфекции у пациента с подавленной иммунной системой может вызвать энцефалит, пневмонию и миокардит, часто с летальным исходом.

У врожденно-инфицированного плода инфекция может распространиться на центральную нервную систему. Последствиями могут быть выкидыши и мертворожденные, если инфицирование происходит в течение первого триместра беременности, и необратимые неврологические повреждения в случае инфицирования во втором и третьем триместре беременности.

Количественная проверка на IgG антитела к *T. gondii* является практичным методом определения иммунного статуса беременных женщин и новорожденных. IgG антитела к *T. gondii* могут присутствовать в организме в течение всей жизни. Следовательно, постоянный титр IgG антител к *T. gondii* указывает на ранее перенесенную инфекцию, в то время как четырехкратное и более увеличение титра является признаком активной инфекции. Последовательное многократное определение уровня IgG антител к *T. gondii* у новорожденных поможет различить врожденное заражение (постоянный уровень) от неонатального (рост титра).

Принцип анализа

В тест-системе **ImmunoComb® Toxo IgG** используется метод непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Твердой фазой является Гребень с 12 выступами (зубцами). Каждый зубец сенсibilизирован в двух местах:

верхняя точка — иммуноглобулинами человека (Внутренний Контроль)

нижняя точка — инактивированными RH антигенами *T.gondii*
Проявочная ванна состоит из 6 рядов (A - F) по 12 лунок в каждом. Все ряды содержат готовые к использованию растворы реагентов для различных этапов анализа. Анализ производится поэтапно, Гребень последовательно переносится из одного ряда лунок в другой с инкубацией на каждом этапе.

Перед началом анализа образцы сыворотки или плазмы крови человека добавляются в растворитель в лунках ряда A Проявочной ванны. Затем в лунки ряда A вставляется Гребень. Антитела к *T. gondii*, если они присутствуют в образце, специфически связываются с антигенами токсоплазмы на нижних точках зубцов Гребня (Рис. 1). Несвязанные компоненты смываются в лунках ряда В. В лунках ряда С IgG антитела к *T. gondii*, захваченные нижними точками зубцов, и иммуноглобулины человека на верхних точках (Внутренний контроль) будут взаимодействовать с антителами к IgG человека, мечеными щелочной фосфатазой (alkaline phosphatase, AP). В следующих двух рядах (С и D) не связавшиеся компоненты удаляются промывкой. В лунках ряда F связанная щелочная фосфатаза взаимодействует с хромогенными компонентами. Результаты реакции наблюдаются визуально в виде серо-синих точек на поверхности зубцов Гребня.

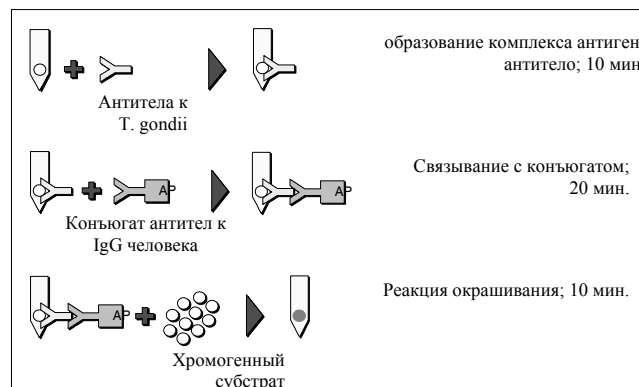


Рис. 1. Принцип анализа

В набор входит Положительный Контроль (содержащий IgG антитела к *T.gondii*) и Отрицательный Контроль, которые используются при анализе каждой группы образцов. При завершении анализа на зубце с Положительным Контролем должны проявиться две серо-синие точки. На зубце с Отрицательным Контролем должна проявиться верхняя точка, а нижняя точка либо отсутствует, либо слабоокрашена. Верхняя точка должна проявиться на всех остальных зубцах, подтверждая, что тест-система не была повреждена во время хранения и транспортировки и анализ проведен правильно.

Состав набора

Гребни

В Набор входит 3 пластиковых Гребня. Каждый Гребень имеет по 12 зубцов, по 1 зубцу на каждый тест (Рис. 2). Каждый зубец сенсibilизирован в двух чувствительных областях:

верхняя точка — иммуноглобулинами человека (Внутренний

Контроль)

нижняя точка — инактивированными RH антигенами *T.gondii*.

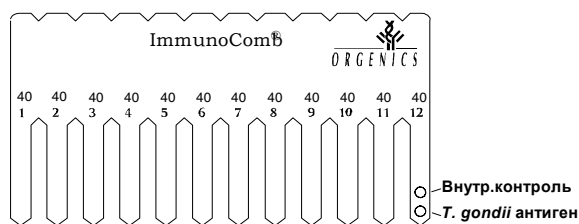


Рис. 2 Гребень

Гребни поставляются в алюминиевых упаковках с влагопоглотителем.

Проявочные Ванны

В набор входят 3 Проявочные ванны. Каждая ванна (Рис. 3) содержит все необходимые для проведения анализа реагенты. Проявочная ванна состоит из 6 рядов (A-F) по 12 лунок в каждом. Содержимое каждого ряда следующее:

Ряд А	растворитель образца
Ряд В	промывочный раствор
Ряд С	козы антигена к IgG человека, меченные щелочной фосфатазой (AP-конъюгат)
Ряд D	промывочный раствор
Ряд E	промывочный раствор
Ряд F	раствор хромогенного субстрата (окрашивающего вещества), содержащий 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфат (BCIP) и нитротетразол синий (NBT)

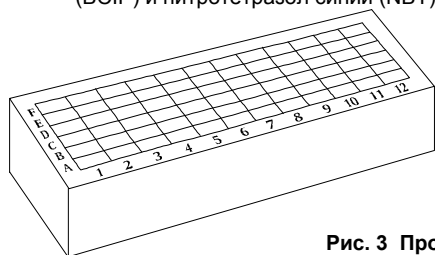


Рис. 3 Проявочная ванна

Положительный Контроль — 1 флакон (красная крышка) 0.2 мл инактивированной нагреванием плазмы крови человека, разведённой до учетного уровня 10 МЕ/мл(IU/мл) IgG антител к *T. gondii*.

Отрицательный Контроль — 1 флакон (зелёная крышка) 0.2 мл инактивированной нагреванием реконструированной плазмы крови человека, отрицательной по антителам к токсоплазме.

Перфоратор — пластиковый стержень для прокалывания алюминиевой фольги, покрывающей лунки Проявочной ванны.

Шкала CombScale™ — для считывания результатов анализа.

Меры Предосторожности

Биоматериалы, использованные при приготовлении набора, были проверены на наличие вируса гепатита В, на наличие антител к вирусу гепатита С и к ВИЧ и показали отрицательный результат. Поскольку ни один тест не может дать полной гарантии в отсутствии вирусного заражения, при работе с исследуемыми образцами и контрольными растворами следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом:

- Используйте хирургические перчатки и лабораторную одежду. Следуйте принятым лабораторным процедурам для работы с человеческой сывороткой или плазмой.
- Не всасывайте растворы в пипетку ртом.
- Обращайтесь со всеми образцами, использованными Гребнями*, Проявочными ваннами и другими материалами в наборе как с потенциально опасными отходами.
- Не смешивайте реагенты из наборов разных серий.
- Не используйте набор после срока годности.

Срок годности, условия хранения и транспортировки

- Срок годности - 12 месяцев.
- Хранить в сухом, защищенном от света месте при температуре 2-8°C. Не допускать замораживания.
- Возможна транспортировка в течение 3-5 суток при темпе-

ратуре не превышающей 26°C. Внутренний контроль тест-системы подтверждает сохранность реагентов при транспортировке.

- После вскрытия набора хранить составляющие его компоненты при температуре 2-8°C.
- Не рекомендуется использовать Гребень и Проявочную ванну более 3 раз после первичного использования.

Подготовка образцов

- Можно анализировать либо сыворотку, либо плазму крови человека.
- Образцы перед анализом можно хранить до 7 дней при температуре 2-8°C. Для более длительного хранения образцы должны быть заморожены до температуры -20°C или ниже.
- После оттаивания все замороженные исследуемые материалы должны быть отцентрифугированы. Аккуратно заберите исследуемый образец из супернатанта (верхний слой). Если на поверхности жидкости образовался липидный слой, убедитесь, что материал для исследования был взят из нижнего прозрачного слоя. Избегайте повторных замораживаний и оттаиваний.
- Антикоагулянты, такие как гепарин, EDTA, цитрат натрия не влияют на результаты теста.
- При экстренных анализах можно использовать цельную кровь (венозную, пальцевую) в количестве, в 2 раза превышающем количество сыворотки или плазмы, указанное в инструкции к тест-системе.

Процедура анализа

Необходимое оборудование

- Прецизионные пипетки - дозаторы со сменными наконечниками для внесения 10 мкл.
- Ножницы
- Лабораторный таймер или часы.

Подготовка к анализу

Доведите все компоненты, Гребни, реагенты и образцы до комнатной температуры (22-26°C), процедуру анализа проводите при этой же температуре.

Подготовка Проявочной ванны

1. Выдержите Проявочную ванну при температуре 37°C в течение 20 минут; либо при комнатной температуре (22-26°C) в течение 3 часов. Перенесите необходимые для проведения анализа компоненты набора (Гребень, образцы, контроли) в помещение с комнатной температурой.
2. Застелите рабочий стол фильтровальной бумагой, которая после окончания работы должна быть уничтожена как биологически опасные отходы.
3. Перемешайте реагенты, встряхивая Проявочную ванну.

Примечание: Не удаляйте всю фольгу, покрывающую Проявочную ванну. Вскрываете фольгу только в соответствии с указаниями инструкции по проведению анализа с помощью сменного наконечника пипетки или перфоратора.

Подготовка Гребня

Внимание: Чтобы обеспечить правильное функционирование теста, не прикасайтесь к зубцам Гребня.

1. Разорвите алюминиевую упаковку с Гребнем вдоль надсечённого края. Извлеките Гребень.
2. Можно использовать Гребень и Проявочную ванну целиком, либо только их часть. Для использования части Гребня:
 - a. Определите количество зубцов, необходимое для анализа образцов и контролей. На каждый тест требуется по одному зубцу. На каждом зубце изображен кодовый номер набора "40" для дальнейшего определения принадлежности к набору его отделенных зубцов.
 - b. Согните Гребень по вертикали и сломайте или отрежьте ножницами (см. Рис. 4) требуемое число зубцов.
 - c. Верните неиспользуемую часть Гребня в алюминиевую упаковку с влагопоглотителем. **Плотно закройте упаковку**, например, канцелярской скрепкой, чтобы избежать проникновения влаги. Храните Гребень в оригинальной упаковке набора при температуре 2-8°C для дальнейшего использования.

* За исключением хранения для документации

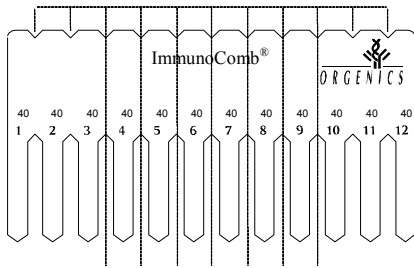


Рис.4.Разделение Гребня

Инструкция по проведению анализа

Реакция Антиген-Антитело (Ряд А).

1. Наберите в пипетку 10 мкл образца. Проколите наконечником пипетки или перфоратором покрытие из фольги над одной из лунок ряда А Проявочной ванны и введите образец на дно лунки. **Перемешайте**, многократно всасывая и вновь впрыскивая раствор в лунку. Смените наконечник пипетки.
2. Повторите этап 1 для всех остальных образцов и контролей. Используйте новую лунку из ряда А и меняйте наконечники пипеток для каждого образца или контроля.
3.
 - a. Вставьте Гребень (печатной стороной к себе) в лунки ряда А, содержащего образцы и контроли. **Перемешивание:** Вынимайте и вставляйте Гребень в лунки несколько раз.
 - b. Оставьте Гребень в лунках ряда А, выдержите 10 минут. Включите таймер. Перед окончанием 10 минут проколите перфоратором фольгу лунок ряда В. Открывайте только необходимое количество лунок.
 - c. Через 10 минут извлеките Гребень из лунок ряда А. **Удалите капли жидкости с заостренных концов зубцов Гребня** с помощью чистой фильтровальной бумаги. Не прикасайтесь к фронтальной поверхности Гребня.

Первая промывка (Ряд В).

4. Вставьте Гребень в лунки ряда В. **Прополощите:** энергично вынимайте и вставляйте Гребень в лунки в течение 10 секунд для более тщательной промывки. Повторите прополаскивание несколько раз в течение 2 минут; между тем проколите фольгу лунок ряда С. По истечении 2 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости** как на этапе 3с.

Связывание с конъюгатом (Ряд С).

5. Вставьте Гребень в лунки ряда С. **Перемешайте** как на этапе 3а. Выдержите Проявочную ванну с Гребнем 20 минут (включите таймер). Проколите фольгу лунок ряда D. Через 20 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Вторая промывка (Ряд D)

6. Вставьте Гребень в лунки ряда D. **Перемешайте** как на этапе 4 в течение 2 минут. Проколите фольгу лунок ряда D. Через 2 минуты извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Третья промывка (Ряд Е).

7. Вставьте Гребень в лунки ряда Е. Несколько раз **прополощите** в течение 2 минут. В промежутках проколите фольгу лунок ряда F. По истечении 2 минут извлеките Гребень и **удалите капли жидкости**.

Цветная реакция (Ряд F).

8. Вставьте Гребень в лунки ряда F. **Перемешайте**. Выдержите Проявочную ванну с Гребнем 10 минут (включите таймер). По окончании 10 минут извлеките Гребень.

Остановка реакции (Ряд Е).

9. Снова вставьте Гребень в лунки ряда Е. По истечении 1 минуты извлеките Гребень и просушите его на воздухе.

Хранение неиспользованных частей набора

Проявочная ванна

Неиспользованные лунки Проявочной ванны можно хранить для дальнейшего применения:

- Заклейте использованные лунки широкой клейкой лентой, во

избежание пролития их содержимого, в случае опрокидывания Проявочной ванны.

Другие компоненты набора

- Верните оставшиеся Проявочные ванны, Гребни, перфоратор, контроли и инструкцию обратно в оригинальную коробку набора. Храните при температуре 2–8°C.

Результаты анализа

Достоверность

Для подтверждения правильной работы теста и достоверности полученных результатов необходимо соблюдение трёх условий (см. Рис.5):

1. На зубце с **Положительным контролем** должно проявиться **две точки**.
2. На зубце с **Отрицательным контролем** должна присутствовать **верхняя точка** (Внутренний Контроль). Нижняя точка либо отсутствует, либо она слабоокрашенная и не влияет на интерпретацию результатов.
3. На каждом зубце тестируемых образцов должна проявиться **верхняя точка** (Внутренний Контроль).

Если одно из трёх вышеперечисленных условий не соблюдается, результаты анализа считаются недействительными, образцы и контроли должны исследоваться повторно.



Рис. 5 Достоверность результата

Считывание и интерпретация результатов

Скрининг

Сравните интенсивность окрашивания нижней точки каждого зубца образца с интенсивностью окрашивания нижней точки зубца Положительного Контроля (Рис.6).

- Точка с интенсивностью **большей** или **равной** интенсивности окрашивания Положительного Контроля указывает на **присутствие** IgG антител к *T.gondii*.
- Отсутствие точки или точка с **меньшей** интенсивностью окрашивания, чем у Положительного Контроля рассматривается как **Отрицательный** результат.



Рис. 6 Результаты теста

Считывание и интерпретация результатов

Количественная визуальная интерпретация результатов.

Уровень IgG антител к *T.gondii* в каждом образце определяется путем сравнения интенсивности окраски **нижней** точки каждого зубца с цветовой шкалой CombScale, входящей в состав набора следующим образом (Рис. 7):

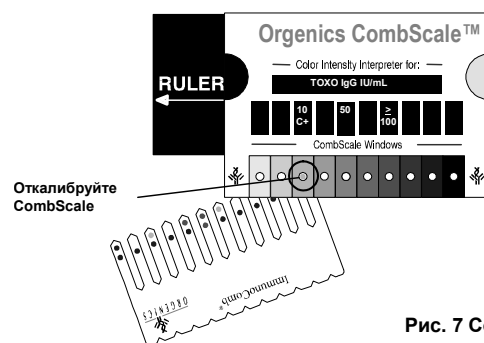


Рис. 7 CombScale

1. Откалибруйте CombScale для оценки титров IgG антител к *T.gondii*. Поместите **нижнюю** точку на зубце с **Положительным Контролем** под наиболее подходящей по интенсивности окраски участок на шкале. Сдвиньте линейку (RULER) так,

чтобы надпись "10 ; C+" появилась в окошечке над участком шкалы с выбранной окраской.

2. Считывайте результаты, не меняя калибровочного положения линейки. Для каждой нижней точки исследуемых образцов подберите участок шкалы наиболее близкий по интенсивности окраски. Запишите число в окошке над этим участком как концентрацию (в МЕ/мл, IU/ml) IgG антител к T.gondii в этом образце.

Документация результатов

Так как окраска точек стабильна, Гребни можно хранить для дальнейшей документации.

Ограничения

Результаты этого анализа, как и результаты любых других анализов, предназначенных для диагностики in vitro, следует рассматривать в совокупности со всеми симптомами, клинической историей и результатами других лабораторных обследований пациента.

Показатели качества теста *

Чувствительность и специфичность набора ImmunoComb® Toxo IgG определялись в мультицентровых исследованиях на 728 образцах по сравнению с ИФА референс-тестами. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты исследований

Контрольный метод	ImmunoComb® Toxo IgG	
	Положительный	Отрицательный
положительный	366	22
отрицательный	10	330

Следующие показатели качества были вычислены исходя из полученных результатов:

Чувствительность - 97.2%
Специфичность – 93.75%

Повторяемость

Произвольно было выбрано 10 Гребней из разных наборов одной серии. Одна положительная сыворотка была проверена 12 раз на каждом из выбранных Гребней. На всех Гребнях наблюдалась одинаковая концентрация IgG антител к T.gondii

Воспроизводимость

3 образца было проверено на Гребнях 3 различных серий. Каждый образец был протестирован несколько раз. Во всех случаях были получены одинаковые концентрации IgG антител к T.gondii.

Интерференция

Не было замечено интерференции с гемолитическими образцами (гемоглобин до 10 мг/мл), образцами с липемией (холестерин до 281.6 мг/дл; триглицериды до 381.0 мг/дл) и с повышенным уровнем билирубина (до 20 мг/дл).

Библиография

1. Montoya JG, Remington JS. 1995. Studies on the serodiagnosis of toxoplasmic lymphadenitis. Clin. Infect. Dis. 20(4):781-789.
2. Naot Y, Guptill DR, Remington JS. 1982. Duration of IgM antibodies of Toxoplasma gondii after acquired toxoplasmosis. J. Infect. Dis. 145:770.
3. Remington JS, McLeod R, Desmotts G. 1995. Toxoplasmosis. In: JS Remington and JO Klein (ed.), Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 4th ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 140-266.
4. Roullet E. 1999. Opportunistic infections of the central nervous system during HIV-1 infection. J. Neurol. 246(4):237-243.
5. Stay-Pedersen B. 1993. Toxoplasmosis in pregnancy. Baillieres. Clin. Obstet Gynaecol. 7:107-137.

Условные Обозначения

	Гребень
	Проявочная ванна
	Положительный Контроль
	Отрицательный Контроль
	Перфоратор
	Перед использованием ознакомьтесь с инструкцией
	Внимание, посмотрите сопроводительные документы.
	Изделие медицинского назначения для диагностики in vitro
	Ограничения температуры
	Содержимого достаточно для 36 тестов
	Уполномоченный представитель в ЕС
	Производитель
	Каталожный номер
	Шкала CombScale™
	Серия
	Срок годности: год-месяц-число
	Серийный номер

Эксклюзивный дистрибьютор в Российской Федерации ЗАО «Биоград»

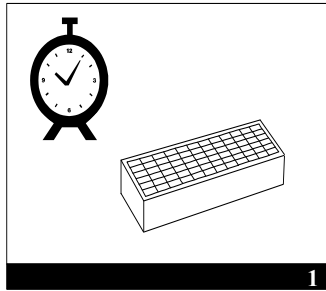
Россия, 197110, г. Санкт-Петербург, Петровский пр., д. 14, литер А, офис 19-Н.
тел/факс: +7 (812) 325 21 70
<http://www.biograd.ru> biograd@biograd.ru

 inverness medical innovations

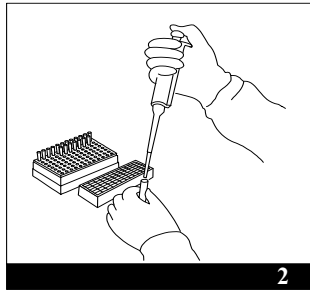
 Orgenics Ltd., P.O.B. 360, Yavne 70650, Israel Tel: + 972 8 942 92 01 Fax: + 972 8 943 87 58 ©2008 Inverness Medical. All rights reserved	EC REP MedNet GmbH Borkstrasse 10 48163 Muenster - Germany Tel: + 49 251 32266-0 Fax: + 49 251 32266-22
	Version: 50440002/R9/OR (03/2009)

* Подробные данные предоставляются по требованию.

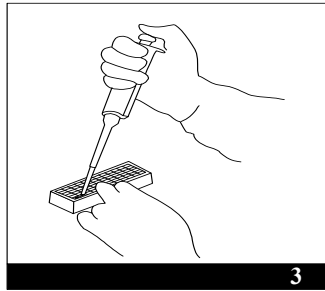
Описание основных этапов анализа



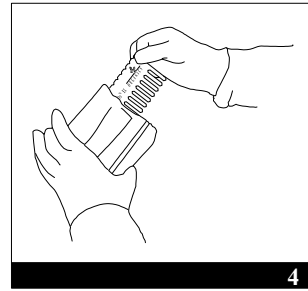
1
Подготовка Проявочной ванны: инкубация 3 часа при комнатной температуре или 20 мин. при 37°C



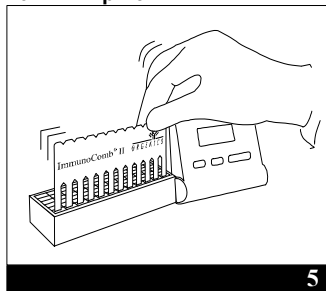
2
Забор образцов и контролей



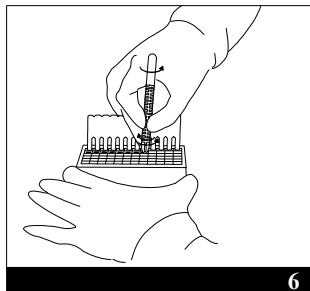
3
Внесение образцов и контролей в лунки ряда А. Перемешивание



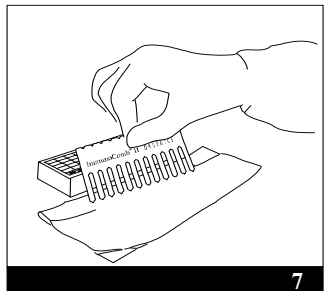
4
Извлечение Гребня из упаковки



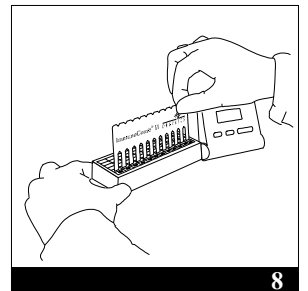
5
Введение Гребня в лунки ряда А и перемешивание. Инкубация



6
Вскрытие лунок ряда В перфоратором

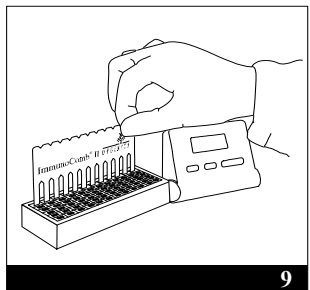


7
Удаление капель жидкости с концов зубцов Гребня

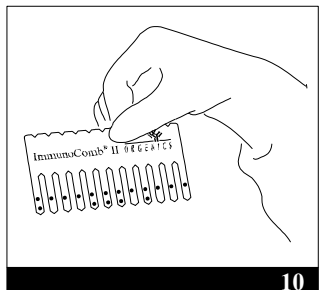


8
Введение Гребня в лунки ряда В и промывание. Инкубация

9
После перемешивания/полоскания и инкубации в рядах С, D и E ...



9
Цветная реакция в ряду F



10
Результаты

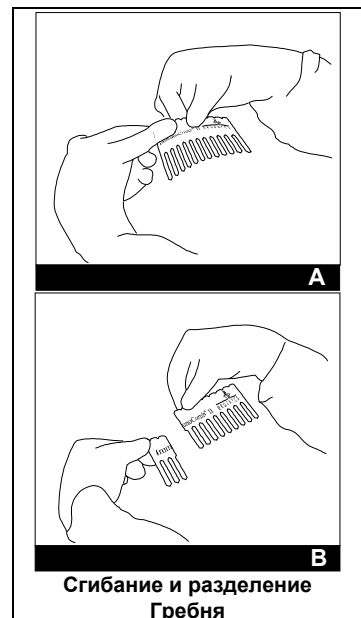
Краткое описание процедуры анализа

Прилагаемая краткая инструкция предназначена для опытных пользователей набора **ImmunoComb® Toxo IgG**. (Полная инструкция приведена выше).

1. Выдержать Проявочную ванну при температуре 37°C в течение 20 минут или при комнатной температуре (22-26°C) в течение 3 часов, довести все необходимые компоненты набора до комнатной температуры. Проводить анализ при комнатной температуре (22-26°C).
2. Внесите по 10 мкл каждого образца и контроля в лунки ряда А Проявочной ванны и перемешайте.
3. Вставьте Гребень в лунки ряда А и продолжайте в соответствии с Таблицей 1.

Таблица 1. Краткое описание процедуры анализа.

Этап	Ряд	Действия
Реакция антиген - антитело	A	Перемешайте; инкубация 10 мин. ; удалите капли
Промывка	B	Прополоскайте; инкубация 2 мин. ; удалите капли
Связывание с конъюгатом	C	Перемешайте; инкубация 20 мин. ; удалите капли
Промывка	D	Прополоскайте; инкубация 2 мин. ; удалите капли
Промывка	E	Прополоскайте; инкубация 2 мин. ; удалите капли
Окрашивание	F	Перемешайте; инкубация 10 мин. ;
Остановка реакции	E	Инкубация 1 мин. ; сушка на воздухе



A
B
Сгибание и разделение Гребня